

Физиология бактерий

- Физиология бактерий включает метаболизм бактерий, т.е. питание, получение энергии, рост и размножения бактерий, а также их взаимодействие с окружающей средой.
- Метаболизм бактерий лежит в основе разработки методов их культивирования, получения чистых культур и их идентификации.
- Выяснение физиологии патогенных и условно-патогенных бактерий важно для изучения патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, постановки микробиологического диагноза, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах с целью получения биологически активных веществ.

Химический состав бактериальной клетки

- Бактериальная клетка на 80-90% состоит из воды и около 10% приходится на долю сухого вещества.
- В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% - углеводы, 9% - липиды, 16% - РНК, 3% - ДНК и 3% - минеральные вещества.

- **Белок.** на его долю приходится 50—80% сухого вещества бактериальной клетки Он распределен в цитоплазме, нуклеоиде, цитоплазматической мембране и других клеточных структурах. К белкам принадлежат ферменты, многие токсины.
- **Нуклеопротеиды** — соединение белка с нуклеиновыми кислотами **ДНК и РНК**. Нуклеиновые кислоты: ДНК определяет генетические свойства, РНК — биосинтез белка.
- **Углеводы** — 12—18% сухого вещества. Это основной источник энергии и углерода. Многие структурные компоненты клетки состоят из углеводов (оболочка, капсула, слизистый слой).
- **Липиды** — составляют ~ 10% сухого остатка. — это запасные вещества, повышающие устойчивость бактерий во внешней среде. Связываясь с белками и углеводами, липиды составляют сложный комплекс, определяющий токсические свойства микроорганизмов.

Метаболизм прокариот.

- **Метаболизм** – совокупность ферментативных процессов, протекающих в клетке и обеспечивающих её энергетические и биосинтетические потребности.
- **Энергетический метаболизм (катаболизм)** — поток реакций, сопровождающийся мобилизацией энергии и преобразованием её в электрохимическую или химическую форму, которая затем используется во всех энергозависимых процессах.
- **Конструктивный метаболизм (биосинтез, анаболизм)** – поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клетки и при этом используется запасённая клеткой энергия.

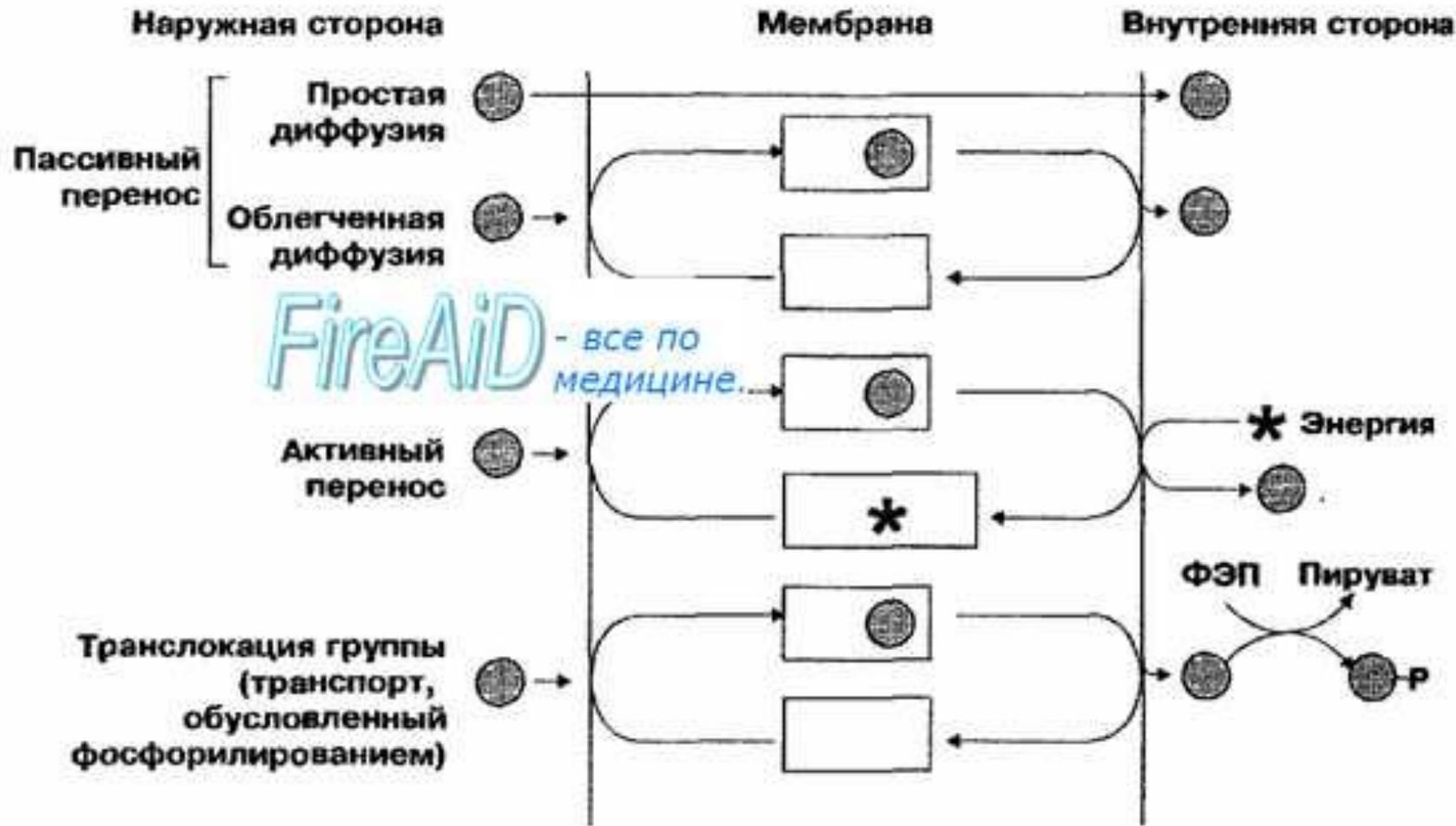
Схема метаболизма



Основные механизмы транспортировки питательных веществ и воды через ЦПМ бактерий

- 1. пассивная диффузия
- 2. облегченная диффузия
- 3. активный транспорт
- 4. транслокация химических групп

Способы транспортировки питательных веществ через ЦПМ



FireAiD - все по медицине

● – транспортируемое вещество; □ – переносчик (белок пермеаза);
 □* – активированный переносчик; ФЭП – фосфоэнолпируват; Р – фосфат

Схема пластического обмена веществ у бактерий

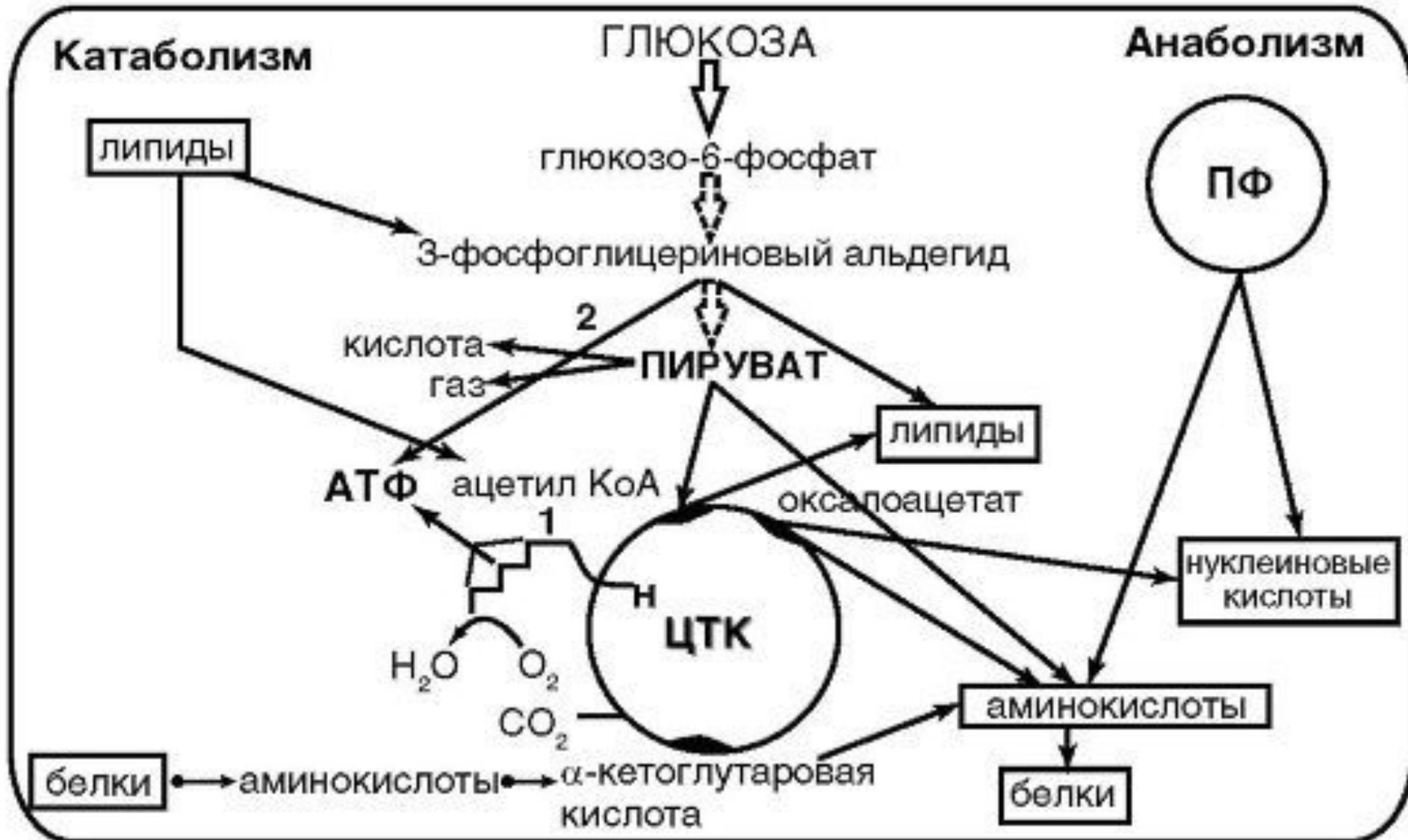
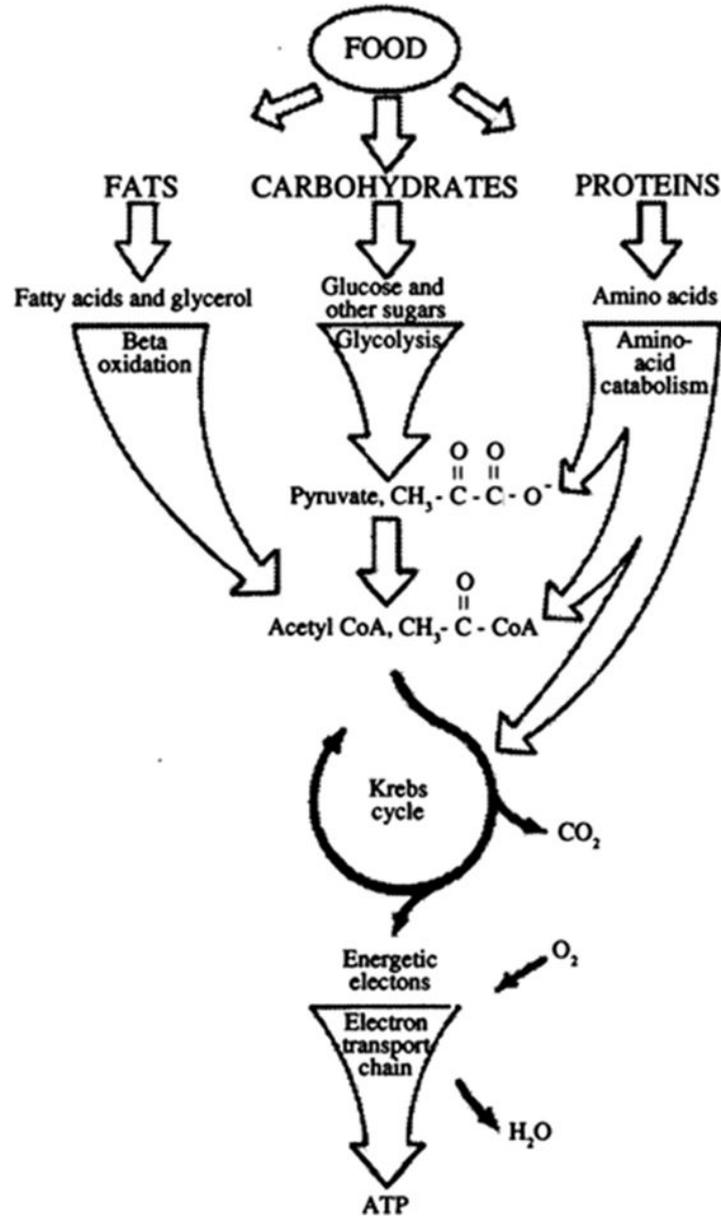
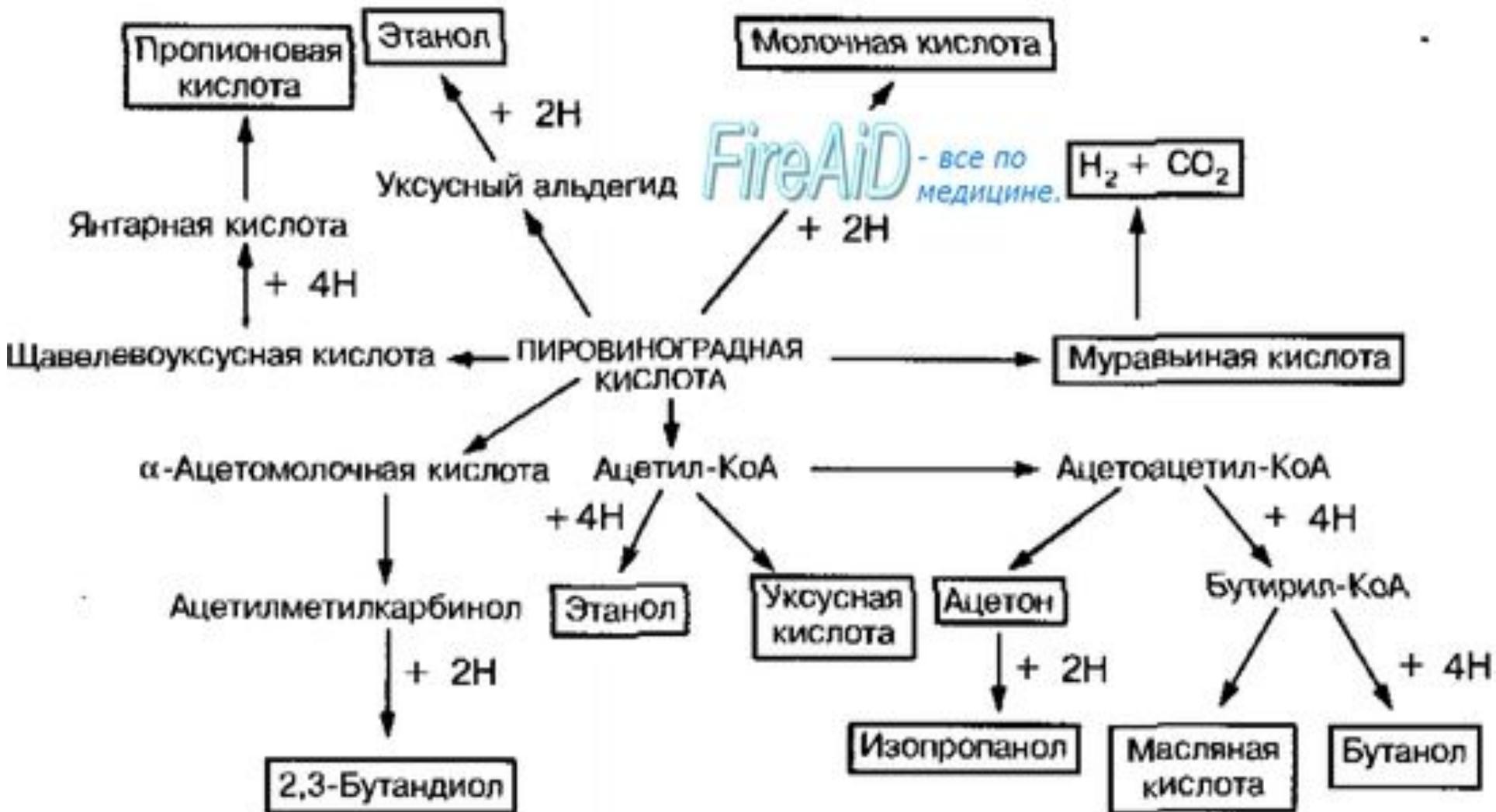


Схема энергетического метаболизма



Субстратное фосфорилирование



Сравните процессы анаэробного и аэробного дыхания

Признаки для сравнения	Анаэробное дыхание	Аэробное дыхание
<ol style="list-style-type: none"> 1. Локализация в клетке 2. Скорость 3. Формы энергии 4. Конечные продукты 5. Количество АТФ 6. КПД процесса 7. Условия протекания 	<p>цитоплазма</p> <p>очень быстро</p> <p>химическая</p> <p>ПВК, молочная к-та, этиловый спирт</p> <p>2 молекулы</p> <p>32 - 40 %</p> <p>отсутствие O₂</p>	<p>митохондрии</p> <p>медленно</p> <p>химич., электрохим.</p> <p>CO₂, H₂O</p> <p>38 молекул</p> <p>45-55 %</p> <p>O₂, дыхательные ферменты, мембраны</p>

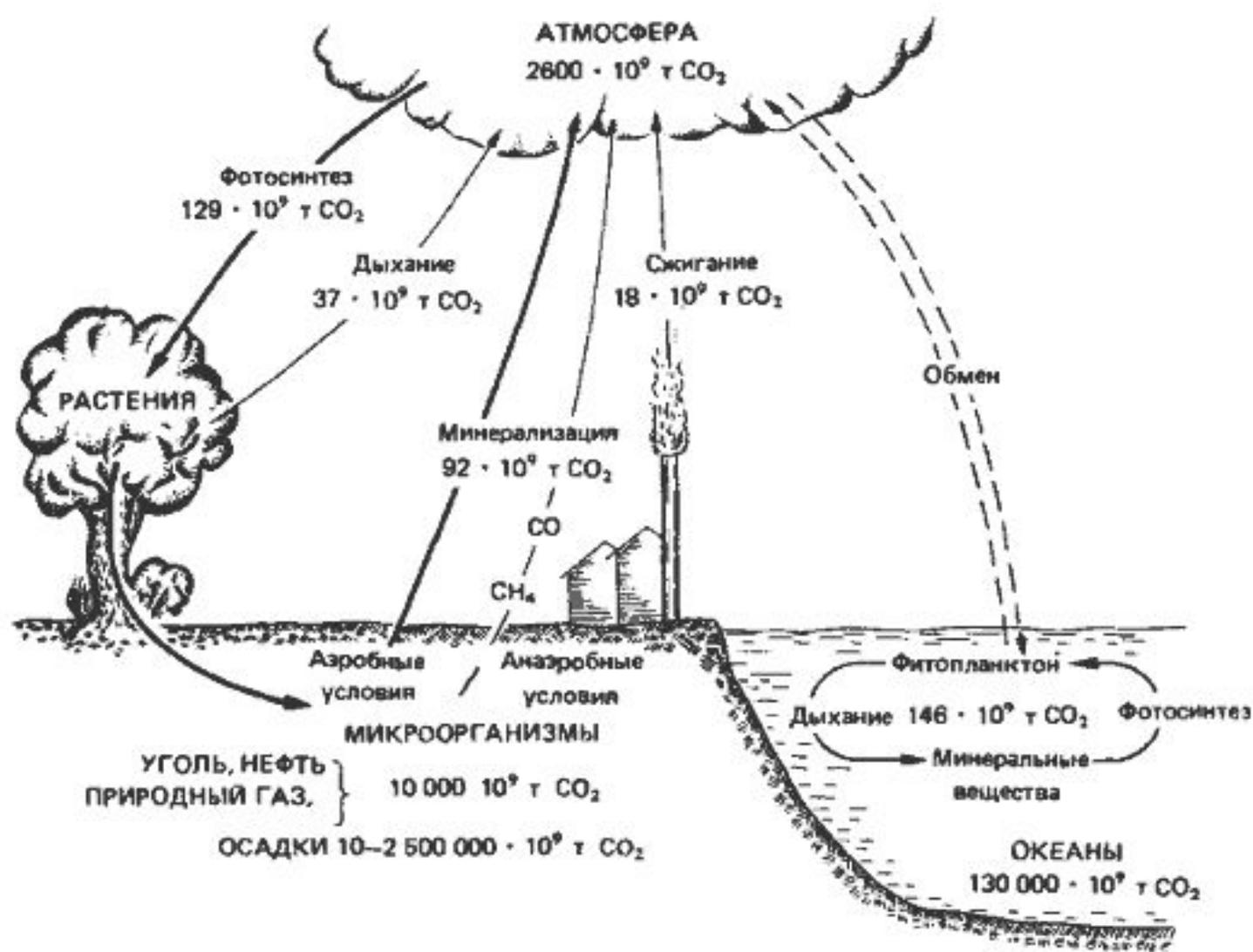


Рис. 1.1. Круговорот углерода в биосфере. Цифры около стрелок указывают годовой оборот CO_2 (фиксация, образование, обмен). Фотосинтетическая фиксация углекислоты зелеными растениями быстро истощила бы ее запасы в атмосфере, если бы органические соединения не разлагались микроорганизмами и не окислялись до CO_2 , что восполняет запас углекислоты в воздухе. Сжигание углеродсодержащего ископаемого топлива (нефти, природного газа, угля) приводит к постепенному росту содержания CO_2 в атмосфере.

Ферменты бактерий

В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к

- 6 классам: *оксиредуктазы*, трансферазы, *гидролазы*, лигазы, лиазы, изомеразы.
- Ферменты, образуемые бактериальной клеткой, могут как локализоваться внутри клетки - *эндоферменты*, так и выделяться в окружающую среду - *экзоферменты*.

Питательные среды для бактерий

Типы питания бактерий

Источник питания	Группы микроорганизмов
1. Углерод	Автотрофы Гетеротрофы
2. Энергия	Фототрофы Хемотрофы
3. Доноры электронов	Литотрофы Органотрофы

Основные требования к питательным средам

- 1. источники С и N определенного состава азотистых веществ, углеводов (глюкоза)
- 2. набор витаминов, минералов
- 3. изотоничность (0, 85% NaCl)
- 4. буферность
- 5. рН (7,2)
- 6. окислительно-восстановительный баланс (eH)
- 7. стерильность
- 8. прозрачность

КЛАССИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

- натуральные и синтетические.
- жидкие, плотные и полужидкие.
- простые и сложные.
- основные и специальные.

по назначению:

- селективные (избирательные) среды
- среды накопления
- консервирующие среды
- дифференциально-диагностические среды

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ — субстраты, состоящие из компонентов, обеспечивающих необходимые условия для культивирования микроорганизмов.



Классификация питательных сред

Питательные среды делят *по консистенции, составу, назначению.*

- В зависимости от *консистенции* различают жидкие (мясопептонный бульон, сахарный бульон), плотные (1-2% мясопептонный агар, свернутая сыворотка), полужидкие (0, 2-0, 5% мясопептонный агар) питательные среды. Для получения П. с. плотной консистенции к жидкой среде добавляют обычно агар-агар - полисахарид, добываемый из морских водорослей, или желатин - вещество белковой природы животного происхождения.
- *По составу среды* могут быть простыми и сложными
- В зависимости от *назначения* выделяют элективные, среды обогащения, дифференциально-диагностические.



Классификация питательных сред

Простые	Сложные
<p><i>Жидкие:</i> ПВ, МПБ <i>Плотные:</i> МПА</p>	<p><i>Специальные:</i> сахар. МПА, МПБ, сывороточный МПА, кровяной МПА (Рис. 7), <i>Обогащения, накопления:</i> селенитовый МПБ, среды Мюллера, Рапопорт, 1% щелочная ПВ Китт-Тароцци <i>Элективныe:</i> 1% щелочной агар, солевой агар <i>Элективно-дифференциальные:</i> среда Плоскирева, ЖСА <i>Дифференциально-диагностические:</i> 1) для определения сахаролитических свойств (среды Гисса, Эндо), 2) для определения протеолитических свойств (свернутая сыворотка, желатин) 3) для определения пептолитических свойств (ПВ) 4) для определения гемолитических свойств (кров. МПА) 5) для определения редуцирующих свойств (среды с метиленовым синим)</p>

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

используют для определения видовой принадлежности исследуемого микроба, основываясь на особенностях его обмена веществ.



ЭЛЕКТИВНЫЕ, ИЛИ ИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

В таких средах созданы благоприятные условия для развития одного вида микроорганизма, размножение всех остальных видов микробов угнетается.

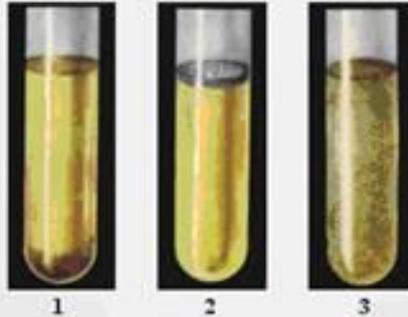
Контейнеры для питательных сред



Культуральные особенности бактерий
BACTERIAL CULTURAL PROPERTIES

Рост бактерий в жидких средах

BACTERIAL GROWTH IN LIQUID MEDIA

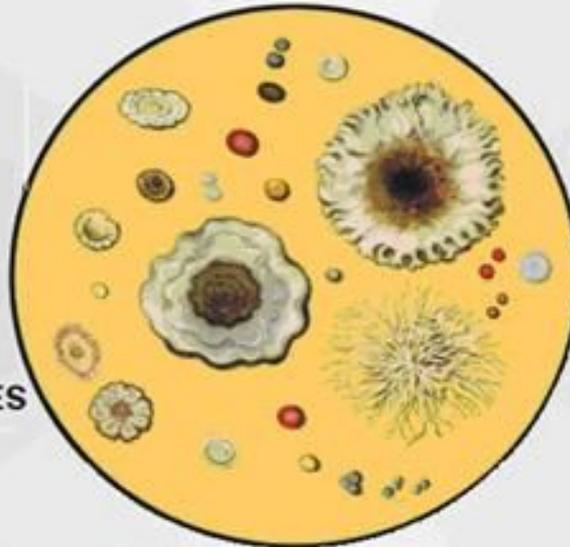


1 - естественный
1 - heavy deposit

2 - в виде пленки
2 - pellicule formation

3 - диффузный
3 - uniform turbidity

Формы колоний
FORMS OF COLONIES



Пигменты (PIGMENTS)



ПИГМЕНТООБРАЗОВАНИЕ

происходит при хорошем доступе кислорода и определенном составе питательной среды. Этот признак генетически детерминирован, поэтому его используют в качестве дифференцирующего критерия.

Бактерии могут образовывать пигменты разного цвета:

- красный — *Serratia marcescens*
- кремовый — *Staphylococcus aureus*
- синий — *Pseudomonas aeruginosa*

Пигменты бактерий

- защищают их от природной ультрафиолетовой радиации,
- участвуют в процессах дыхания, реакциях синтеза,
- обладают антибиотическим действием.



Types of colonies on solid media

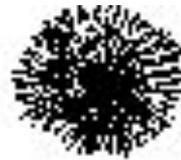
FORM



Punctiform



Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle (lens)

ELEVATION



Flat

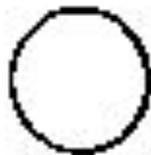
Raised

Convex

Pulvinate

Umbonate

MARGIN



Entire
(even)



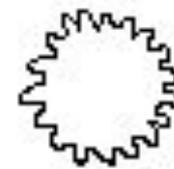
Undulate
(wavy)



Filamentous



Lobate
(lobes)



Erose
(serrated)



Curled

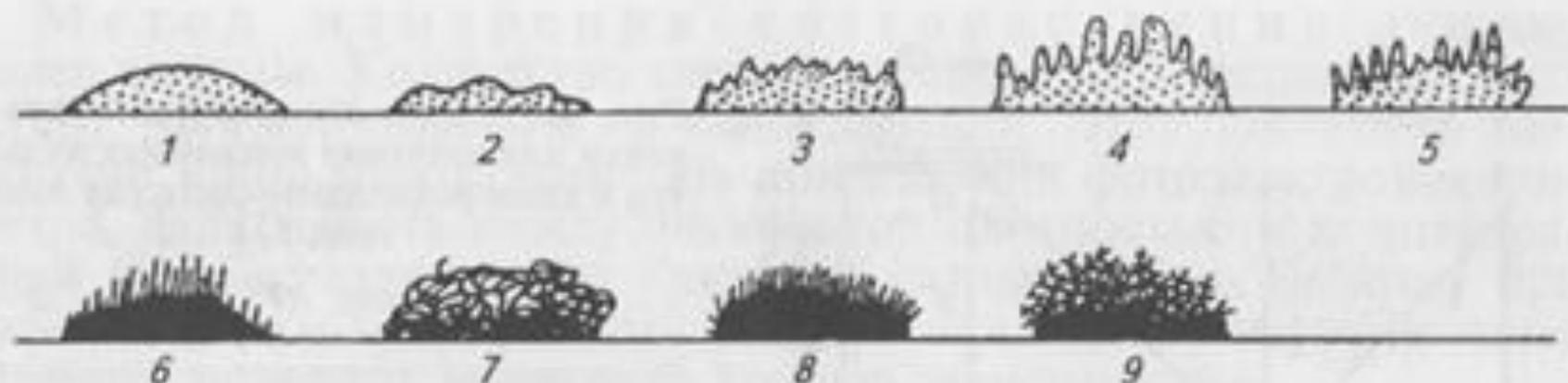


Рис. 43. Край колонии:

1 — гладкий; 2 — волнистый; 3 — зубчатый; 4 — лопастной; 5 — неправильный; 6 — реснитчатый; 7 — нитчатый; 8 — ворсинчатый; 9 — ветвистый

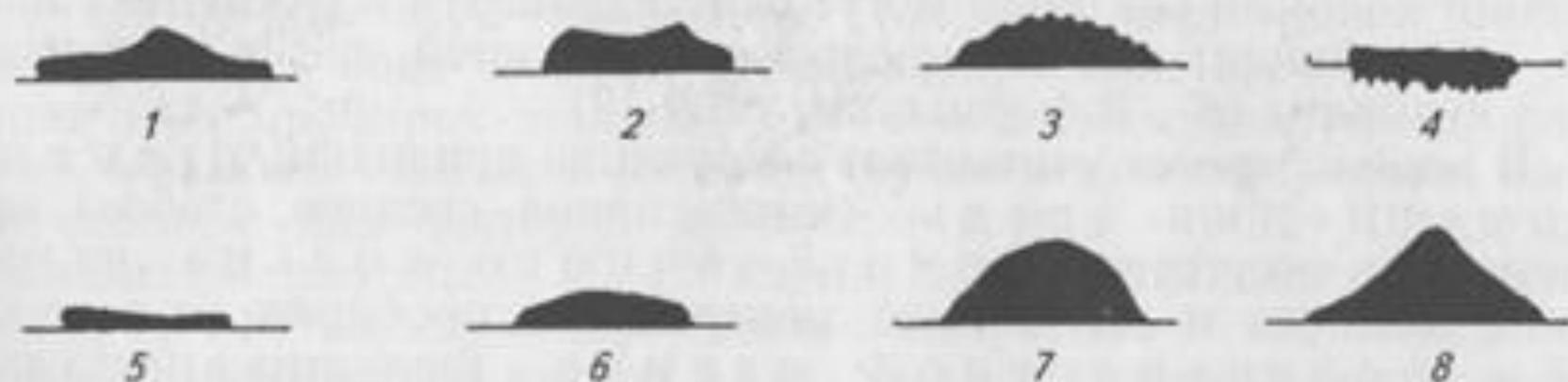
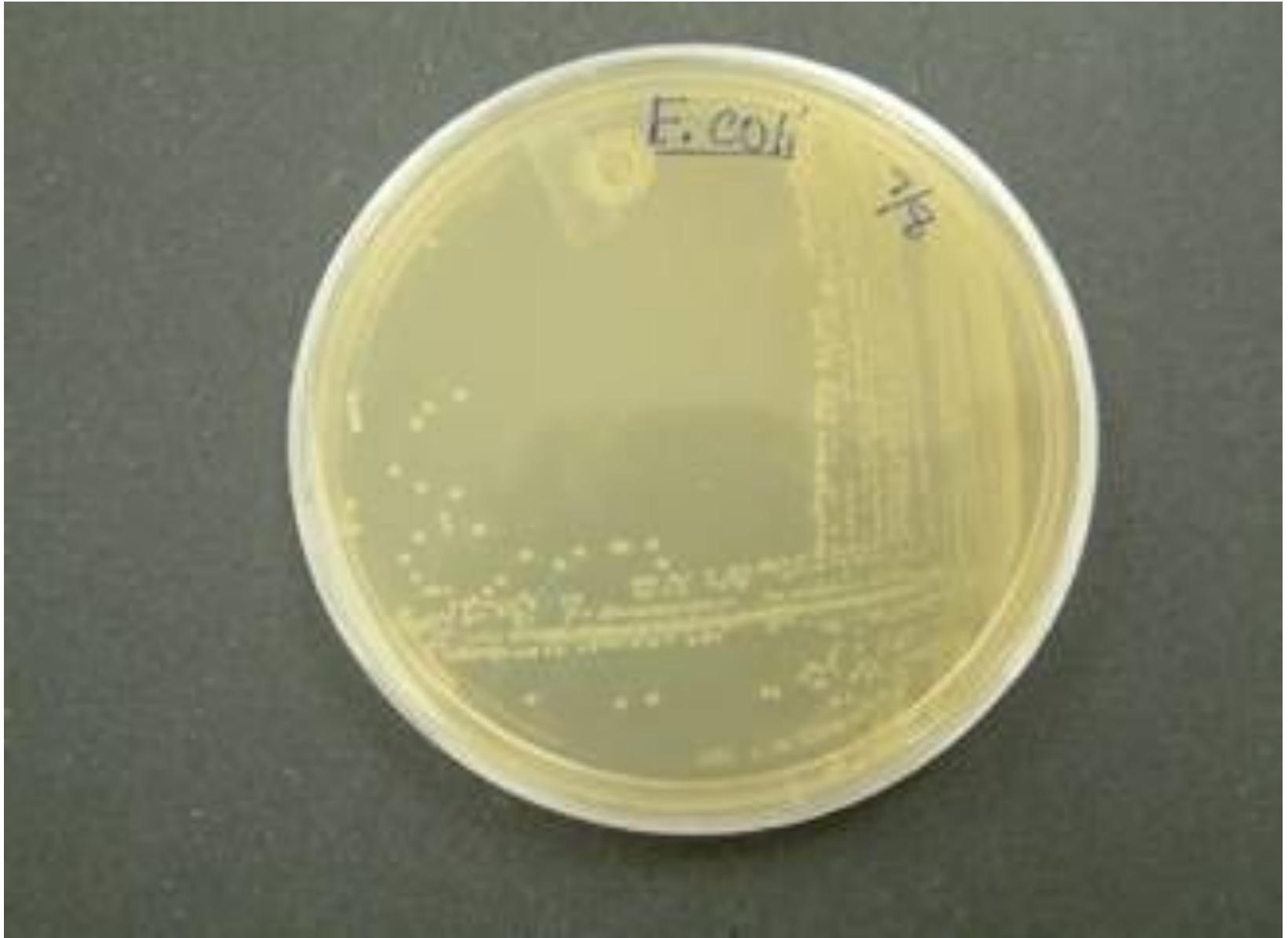


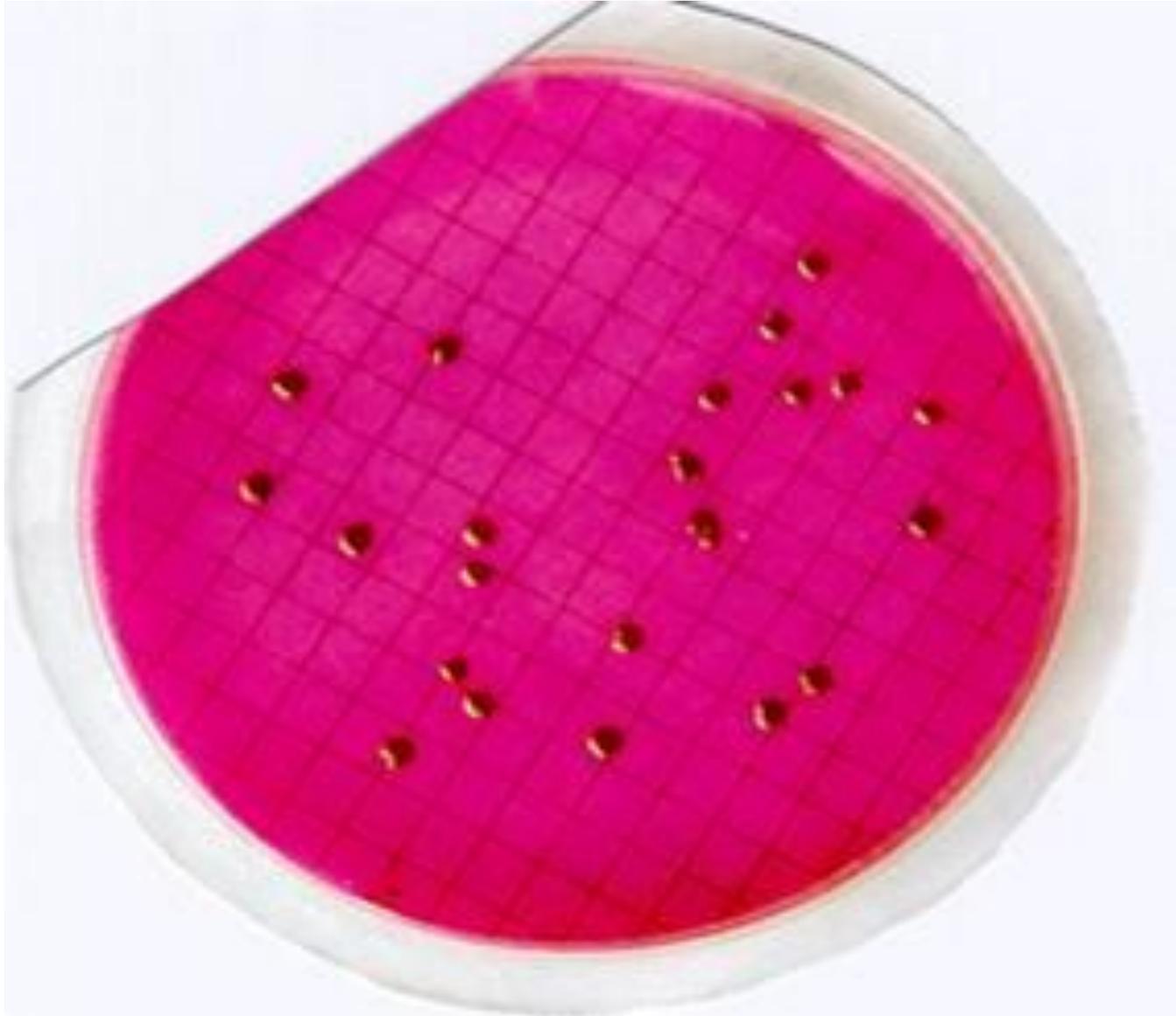
Рис. 44. Профиль колонии:

1 — изогнутый; 2 — кратерообразный; 3 — бугристый; 4 — врастающий в субстрат; 5 — плоский; 6 — выпуклый; 7 — каплевидный; 8 — конусовидный

ΜΠΑ



Лактозо-позитивные колонии Среда Эндо



Лактозо-негативная культура на среде MacConkey



Среда Плоскирева

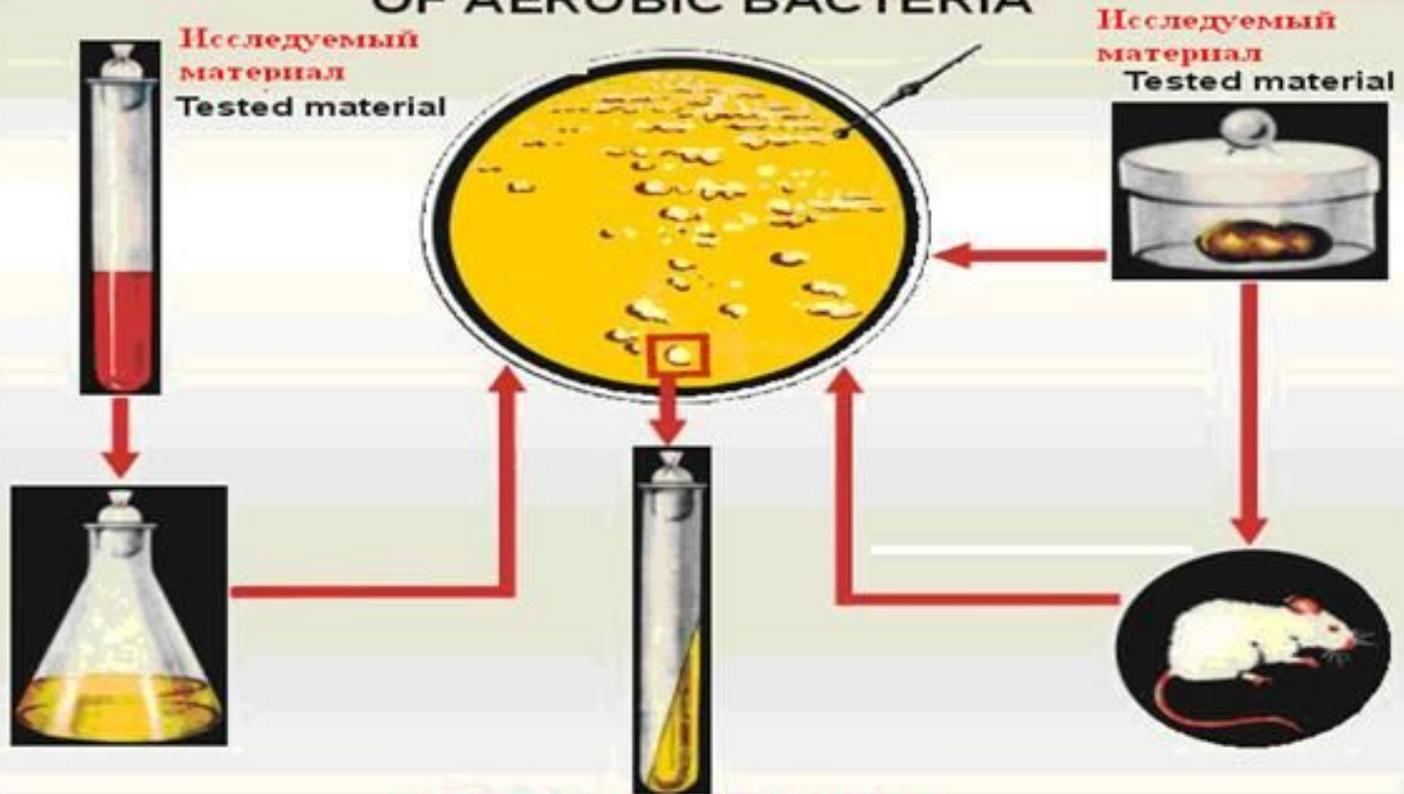
Лактозо-позитивные и лактозо-негативные
КОЛОНИИ



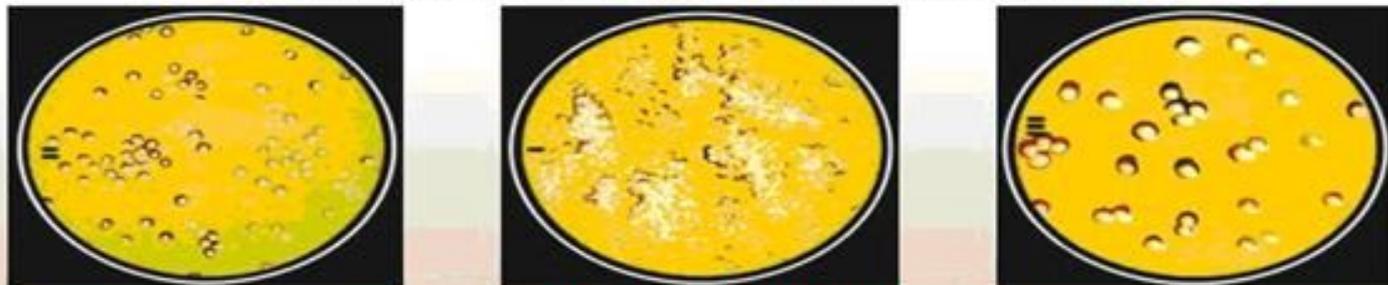
Чистые культуры бактерий

- Чистые культуры бактерий – принадлежащие к 1 виду
- Необходимы для идентификации возбудителя инфекции и определения чувствительности к х/т препаратам

Выделение чистых культур аэробов
ISOLATION OF A PURE CULTURE
OF AEROBIC BACTERIA



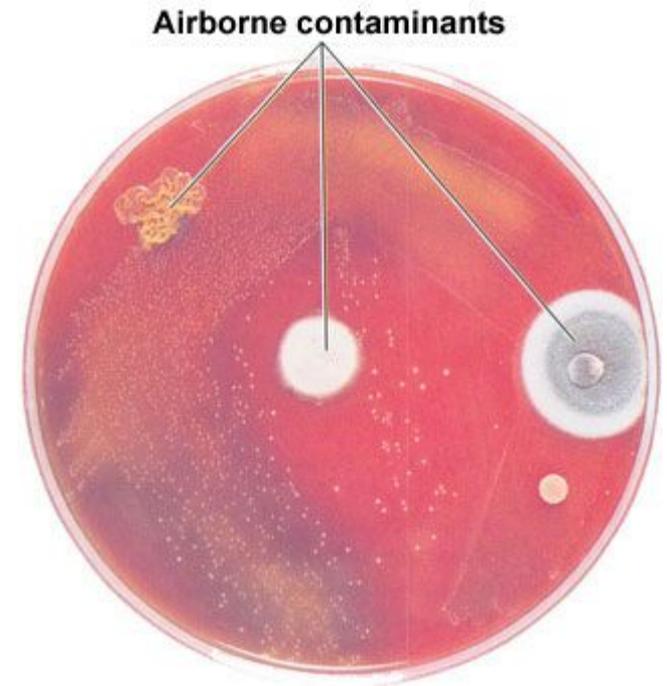
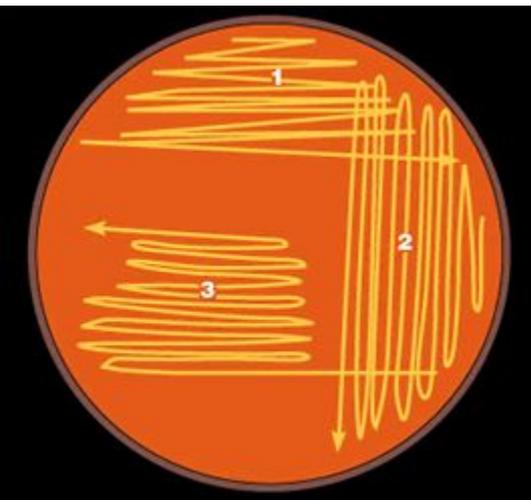
Посев за методом Дригальского
DRYGALSKY'S TECHNIQUE OF INOCULATION



Среда накопления
Enriched medium

Получение чистых культур

- Streak Dilution Technique for obtaining isolated colonies
- area 3 demonstrates well-isolated colonies of two different types of bacteria





Klebsiella pneumoniae



Morganella morganii



***Providencia
alkalifaciens***



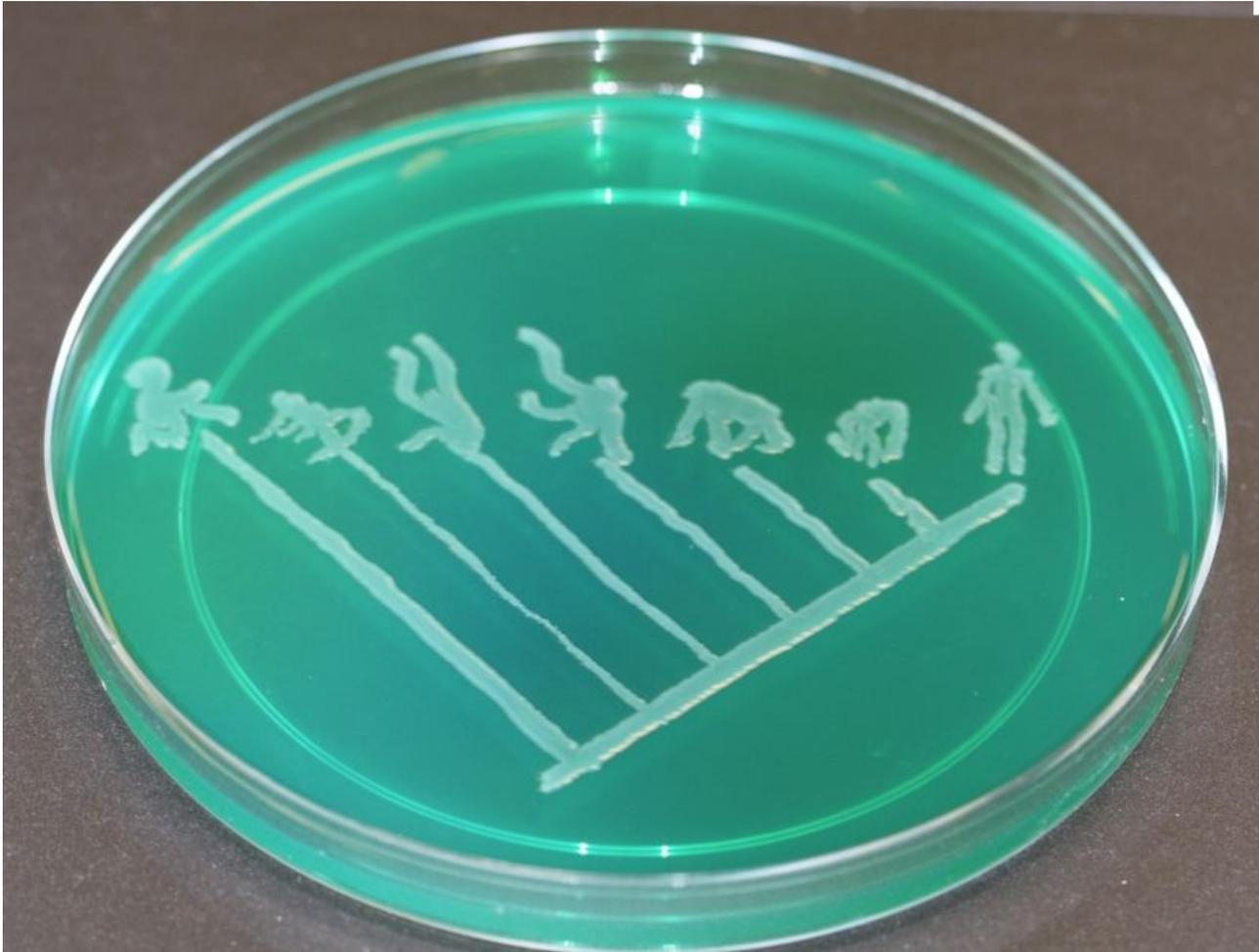
***Salmonella
typhimurium***



Darwin, as portrayed on agar using E. coli, by students in the Gregory lab. Source



Primate phylogeny created with *E. coli* on colored agar.
By graduate students in the Gregory Lab at the
University of Guelph.



Культивирование бактерий

- Культивирование бактерий в системах *in vitro* осуществляется на питательных средах. Искусственные питательные среды должны отвечать определенным требованиям и содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.
- Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен содержаться органический источник углерода и энергии. Эту функцию выполняют различные органические соединения: углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды. Наибольшим энергетическим потенциалом обладает глюкоза, так как она непосредственно подвергается расщеплению с образованием АТФ и ингредиентов для биосинтетических путей.
- Для синтеза белков, нуклеотидов, АТФ, коферментов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты и другие минеральные вещества, в том числе микроэлементы. Источником азота может служить пептон; пептон - продукт неполного гидролиза белков, состоящий из поли-, олиго- и дипептидов. Пептон также поставляет аминокислоты для построения бактериальных белков. Кроме того, большинство бактерий способны использовать соли аммония в качестве источника азота. Сера и фосфор бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей: сульфатов и фосфатов. Для нормального функционирования ферментов бактериям требуются ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , которые добавляют в питательную среду в виде солей, чаще всего фосфатов.
- Решающее значение для роста многих микроорганизмов имеет pH среды. Поддерживание определенного pH имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от ими же образованных продуктов обмена.
- Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способны расти на изотоничных средах, изотоничность которых достигается добавлением NaCl в концентрации 0,85%. Некоторые бактерии не способны расти на средах при концентрации соли в них ниже 1%. Такие бактерии называются галофильными. Так как устойчивость к осмотическому давлению определяется наличием у бактерий клеточной стенки, бактерии, лишенные клеточной стенки, микоплазмы L-формы, могут расти на питательных средах, содержащих гипертонический раствор, обычно сахарозы. При необходимости к питательной среде добавляют факторы роста, ингибиторы роста определенных бактерий, субстраты для действия ферментов, индикаторы.
- Питательные среды должны быть стерильными.

Условия культивирования бактерий

- Наличие полноценной стерильной *питательной среды*.
- *Температура культивирования*. Температура влияет на скорость размножения. Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы - термостаты.
- *Атмосфера культивирования*.
- *Время культивирования* зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18-48 ч. Для культивирования возбудителя коклюша требуется 5 сут, для культивирования *M. tuberculosis* - 3-4 нед.
- *Освещение*. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используется при их идентификации.

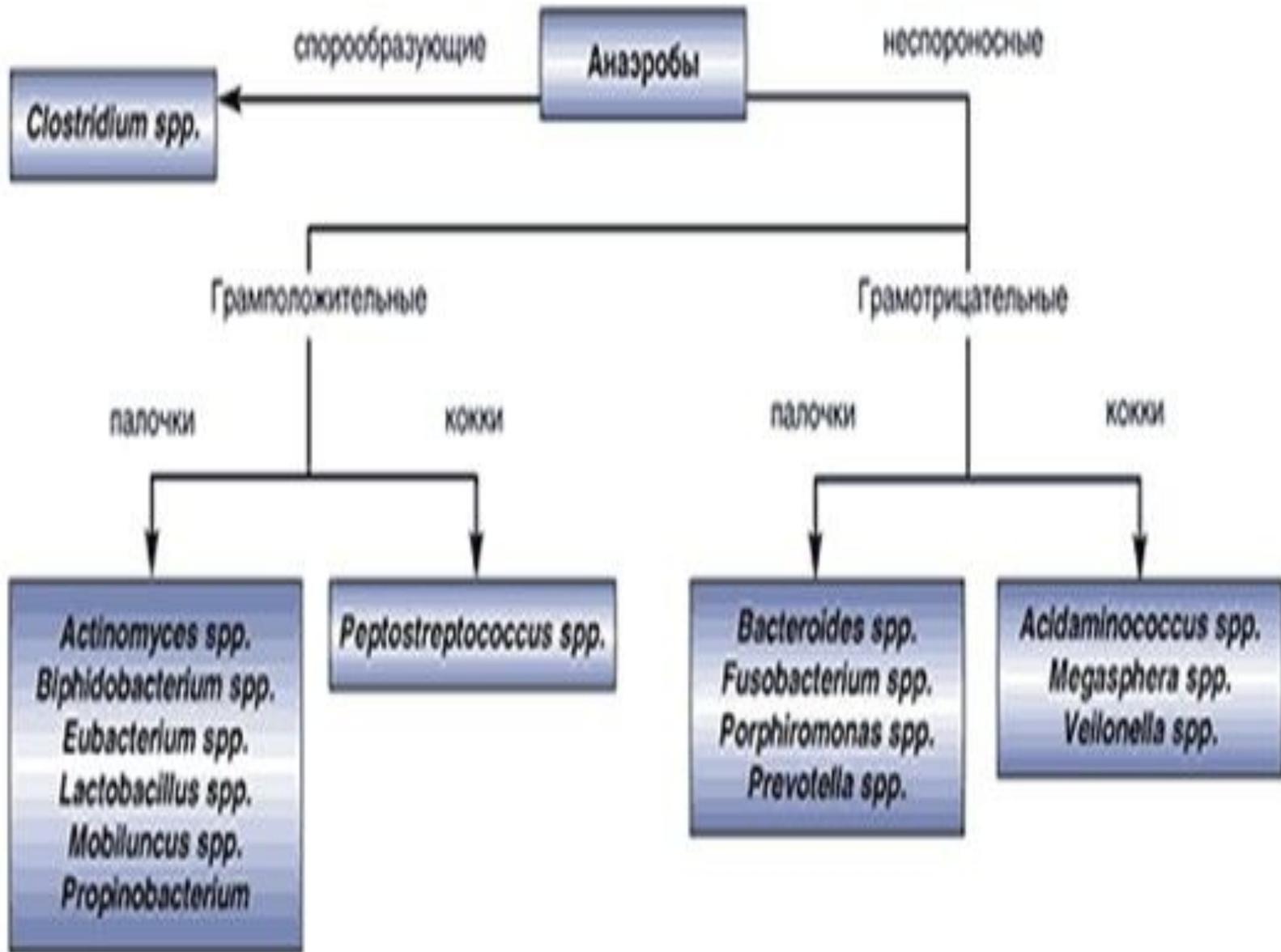
Классификация микроорганизмов по отношению к температуре

Микроорганизмы	Температурные Границы размножения, °С	Место существования
Психрофильные	0—20	Водоемы холодных морей и океанов, почва полярных регионов и зон вечной мерзлоты
Мезофильные	20—45	Организм животных и человека
Термофильные	45—70	Верхние слои почвы, горячие источники, навоз, торф,

Классификация бактерий по типам дыхания

- **Облигатные аэробы** (возбудители туберкулеза, холеры) – микроорганизмы, для оптимального роста которых необходимо 21 % кислорода.
- **Облигатные анаэробы** (возбудители столбняка, ботулизма, газовой анаэробной инфекции, бактероиды, фузобактерии) – бактерии, которые растут при отсутствии свободного молекулярного кислорода за счет процессов брожения. Они получают кислород из органических соединений в процессе их метаболизма. Некоторые из них не выносят даже незначительного количества свободного кислорода.
- **Факультативные анаэробы** (стафилококки, эшерихии, сальмонеллы, шигеллы и другие) – приспособились, в зависимости от условий среды (наличие или отсутствие кислорода), переключать свои метаболические процессы с использованием молекулярного кислорода на брожение и наоборот.
- **Микроаэрофилы** (молочнокислые, азотфиксирующие бактерии) – группа микробов, для которых концентрация кислорода при культивировании должна быть уменьшена до 2 - 5 %. Высшие его концентрации способны задерживать рост.
- **Капнеические** (возбудитель бруцеллеза бычьего типа) – микроорганизмы, которые требуют, кроме кислорода, еще и до 10 % углекислого газа.

Анаэробы



Культивирование анаэробов. Анаэроостаты и газогенерирующие пакеты



Культивирование абсолютных внутриклеточных паразитов, -

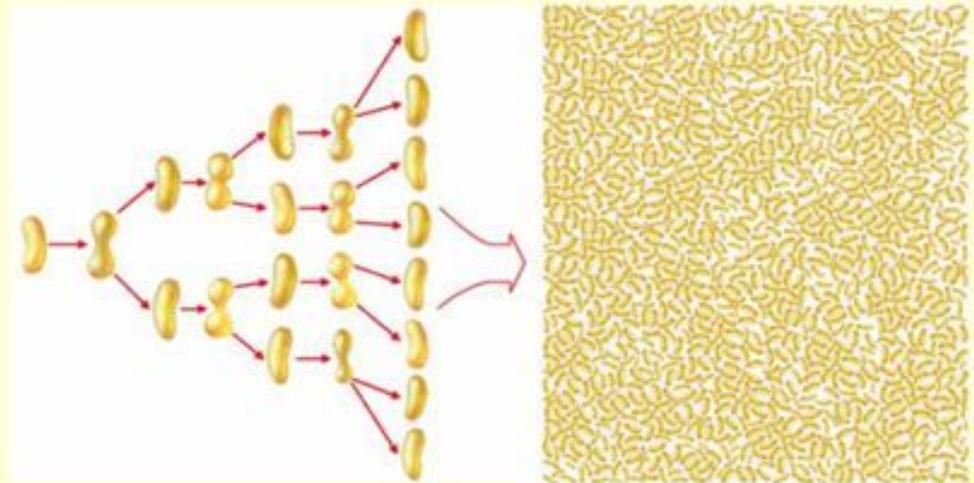
бактерий, относящихся к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella*,
Chlamydia

осуществляют

- на культурах клеток
- в организме животных и членистоногих
- в куриных эмбрионах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы используют также для культивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, например родов *Borrelia*, *Legionella*.

РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

- Клетки бактерий при благоприятных условиях очень быстро размножаются, делясь надвое. Если клетка удваивается каждые пол часа, то за сутки она способна дать 281474976710656 потомков. А некоторые бактерии способны размножаться еще быстрее.

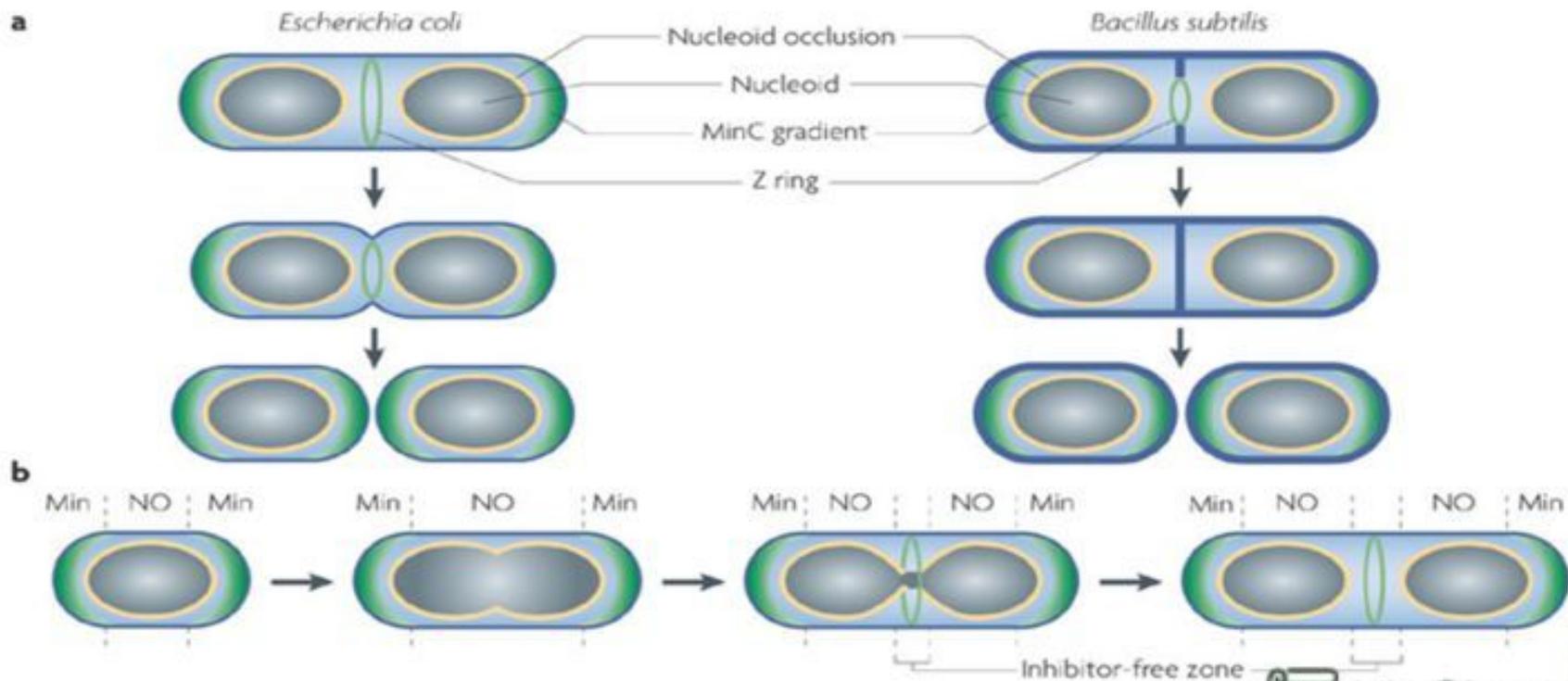


Репликация и деление бактерии



Рост и размножение бактерий

В отличие от многоклеточных организмов, увеличение в размере бактерий (рост клетки) и их размножение путем деления тесно связано с их одноклеточностью. Бактерии растут до фиксированного размера и затем размножаются путем деления пополам, это вид бесполого размножения.

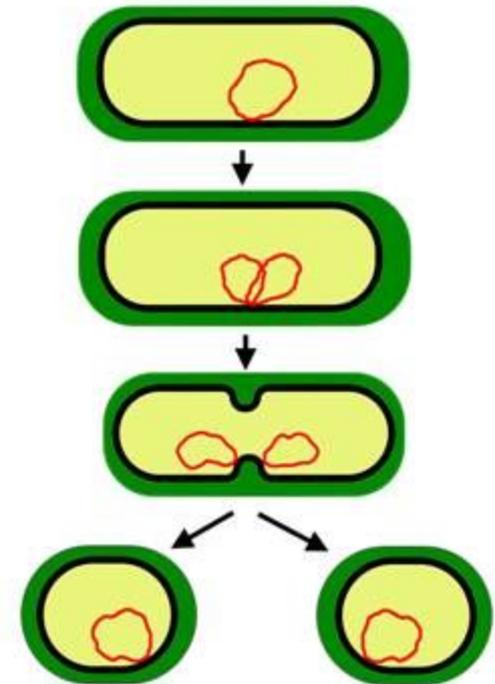


Формы бесполого размножения

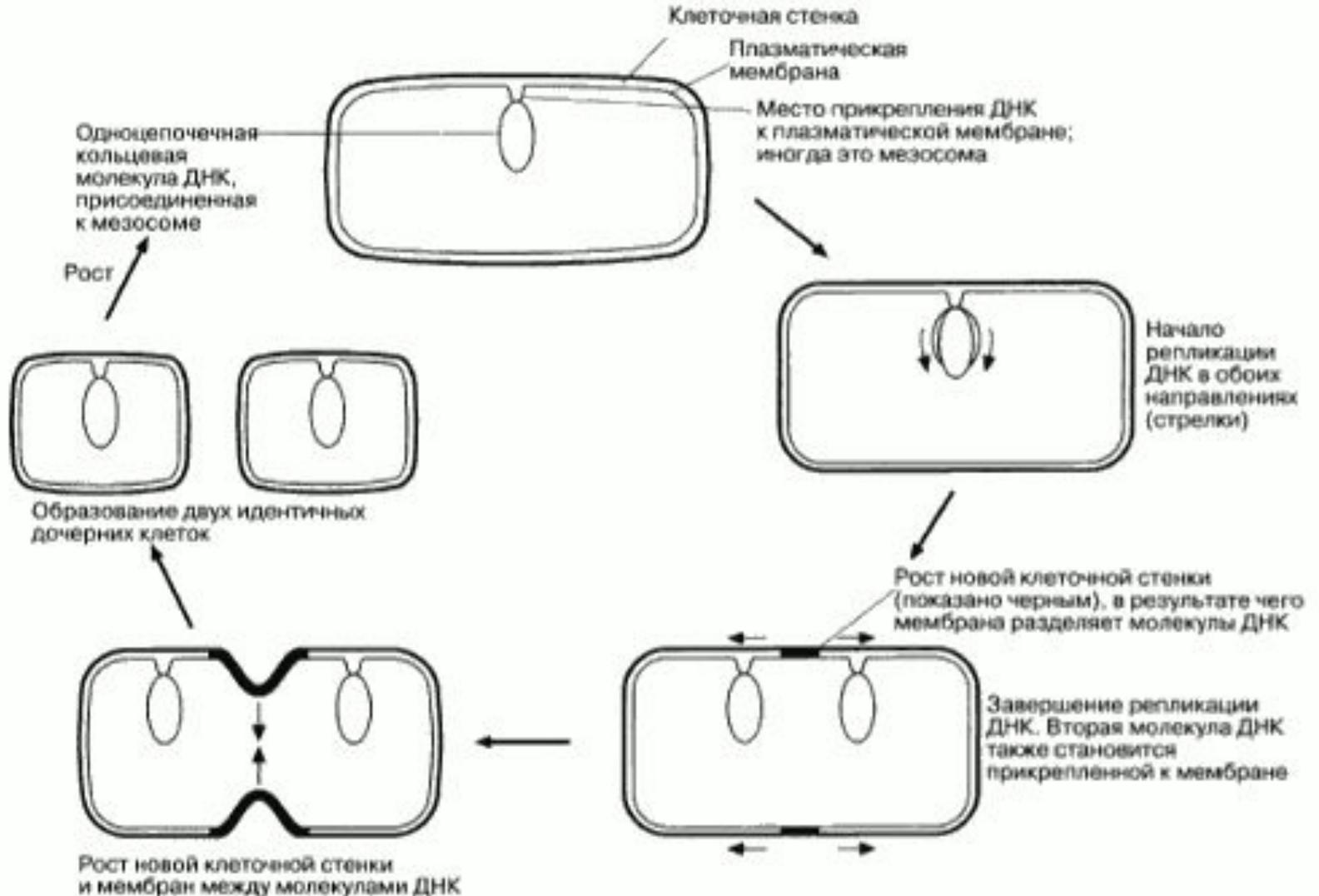
Основной способ размножения бактерий – *бесполое размножение: деление клетки надвое, почкование*. Так как отсутствует ядро, это деление митозом назвать нельзя.

Бинарное деление: перед делением происходит репликация ДНК, мезосома делит клетку на две. Некоторые бактерии при благоприятных условиях способны делиться каждые 20 минут.

Почкование: некоторые бактерии размножаются путем почкования. При этом на одном из полюсов материнской клетки формируется почка, в нее переходит один из поделившихся нуклеоидов. Почка разрастается, превращаясь в дочернюю клетку, и отделяется от материнской.



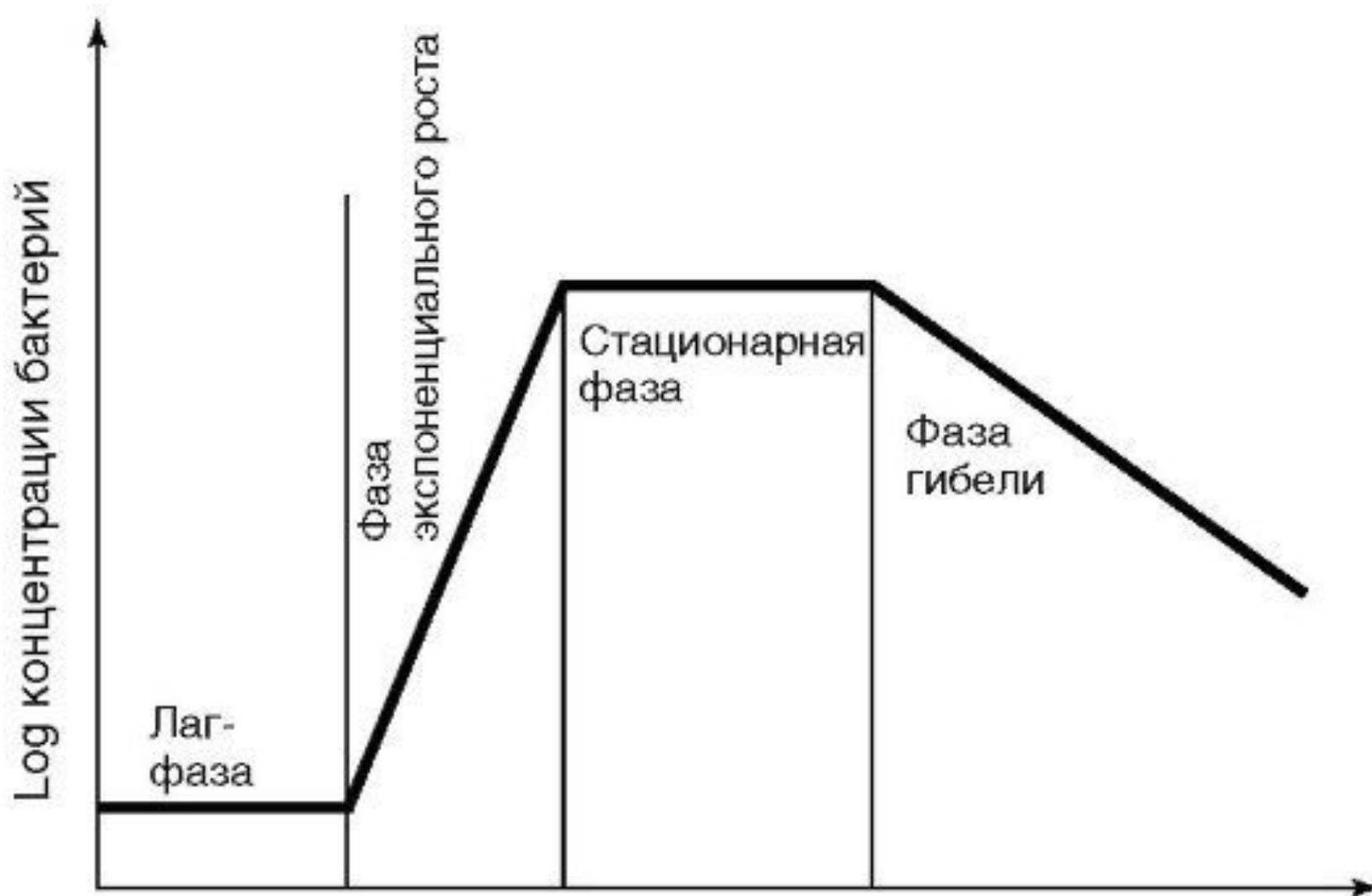
Бесполое размножение бактерий (например *E. coli*) простым делением



Помимо бинарного деления, некоторые бактерии имеют иные способы размножения

- Актиномицеты могут размножаться *путем фрагментации гифов*. Представители семейства Streptomycetaceae размножаются *спорами*.
- Микоплазмы могут размножаться *фрагментацией и почкованием*.
- Хламидии имеют цикл развития в двух формах: внеклеточных инфекционных, малых размеров элементарных телец, не обладающих способностью к бинарному делению, и внутриклеточных, метаболически активных, крупных размеров ретикулярных телец, способных к бинарному делению.
- *Treponema pallidum* в неблагоприятных условиях способны образовывать *цисты*, которые, распадаясь на зерна, дают потомство новым бактериальным клеткам.

Кривая бактериального роста в жидкой питательной среде



- Размножение бактерий в жидкой питательной среде:

- фаза исходная (латентная): адаптация бактерий к питательной среде, начало размножения (лаг - фаза);
- фаза логарифмическая: бактерии энергично размножаются;
- фаза стационарная: концентрация бактерий в среде постоянная;
- фаза отмирания: жизнеспособных клеток мало, постепенно они отмирают.
- В жидких средах микроорганизмы образуют либо равномерную муть, либо осадок, или плёночку (придонный, диффузный или поверхностный рост).

Ламинарный бокс

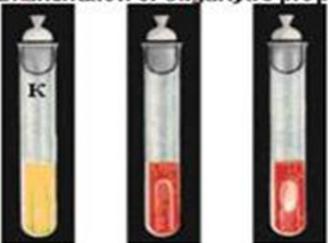


Биохимическая идентификация бактерий

Биохимическая активность бактерий
BIOCHEMICAL ACTIVITY OF BACTERIA

Определение сахаролитических особенностей
 Examination of sugarlytic properties

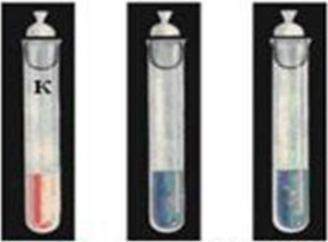
Определение протеолитических особенностей
 Examination of proteolytic properties



1. Кислота
1. Acid

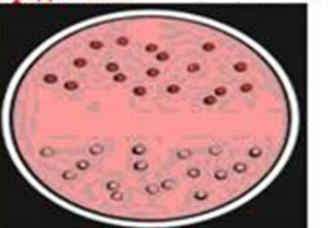
2. Газ
2. Gas

1 2



К - контроль (control)

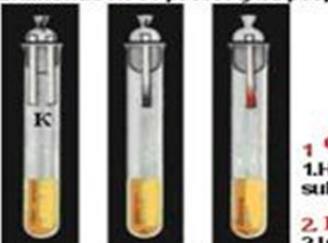
Среда Гисса (Hiss's media)



Среда Ендо
Endo's medium



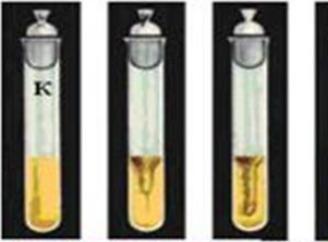
Среда Ресселя
Ressel's medium



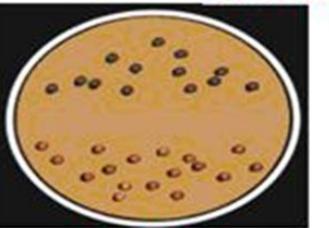
1. Сероводород
1. Hydrogen sulphide

2. Индол
2. Indol

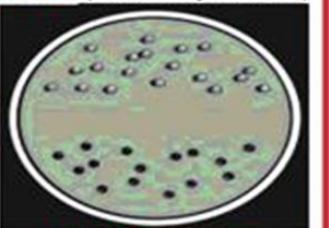
1 2



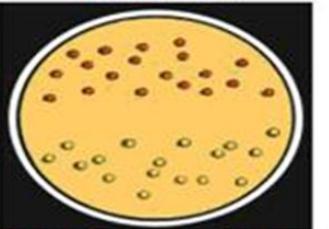
Разложение желатина (Gelatin liquefaction)



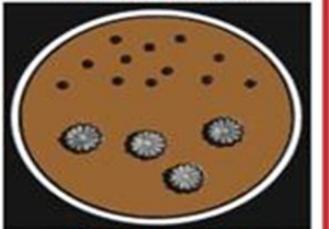
Среда Левина
Levin's medium



Среда Плоскерова
Ploskrev's medium



Висмут -сульфитный агар
Bismuth-sulphite agar



Среда Клауберга
Klauber's medium



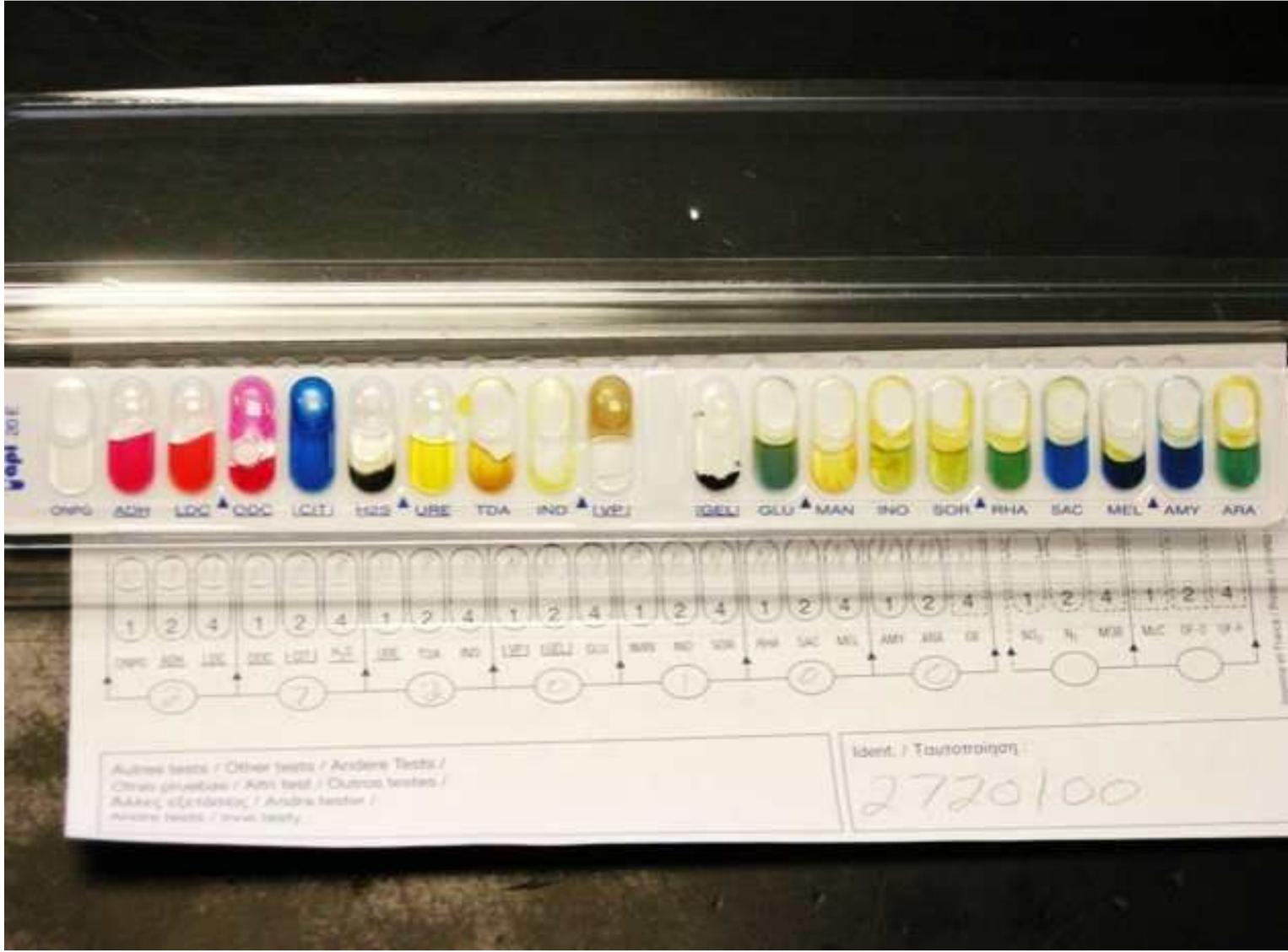
«Пестрый ряд»

Salmonella серовара *Typhi*

Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Маннит	Сахароза	Пептонная вода	
					индол	H ₂ S
K	-	K	K	-	+	

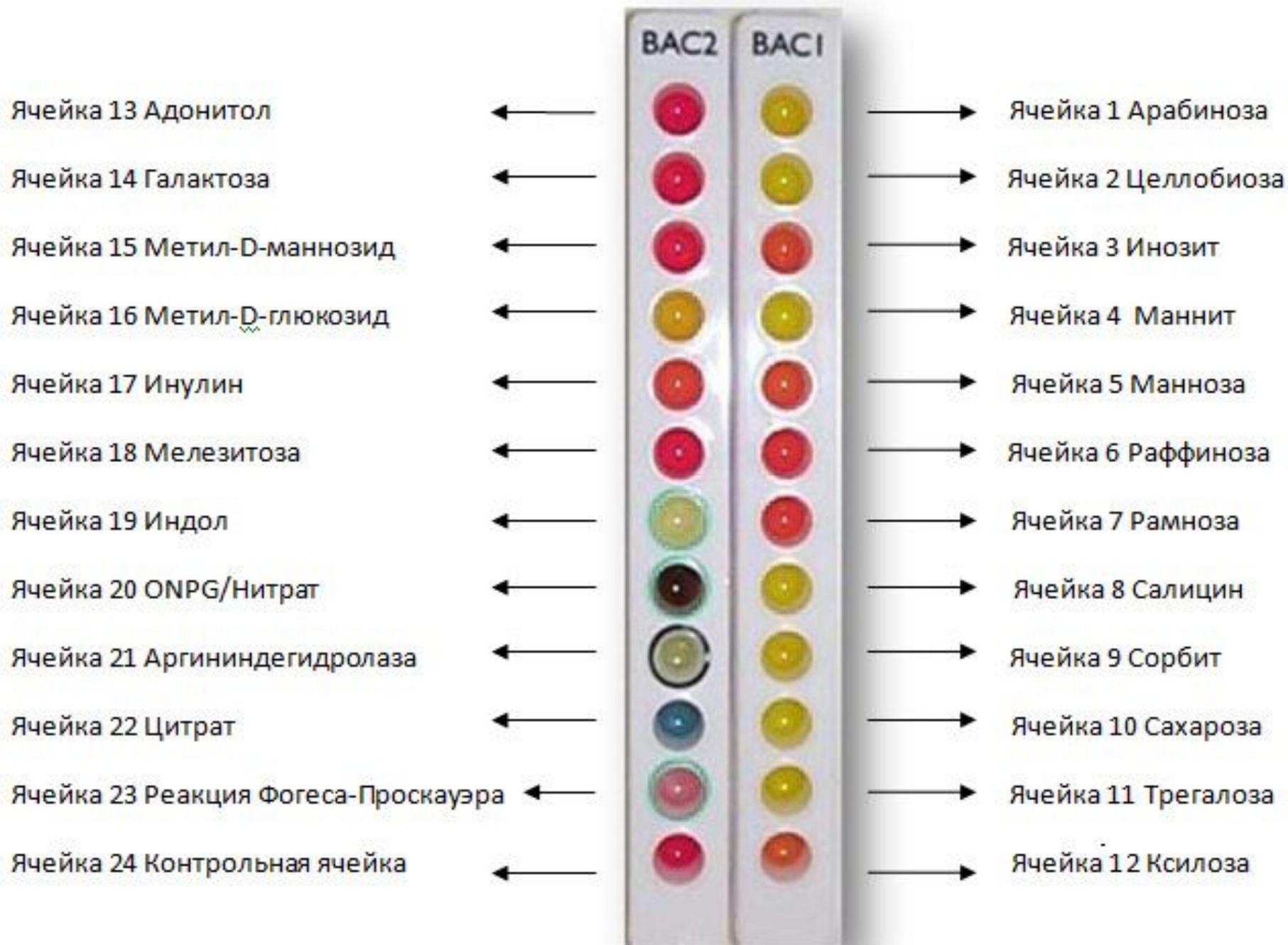


API-20E Strips



API-20E Strips





Автоматический бактериологический анализатор SENSITITRE





Отделение лабораторной диагностики Чебоксары



Автоматический микробиологический анализатор позволяет провести: идентификация бактерий и дрожжей; и исследование чувствительности к антибиотикам клинически значимых бактерий - Чебоксары

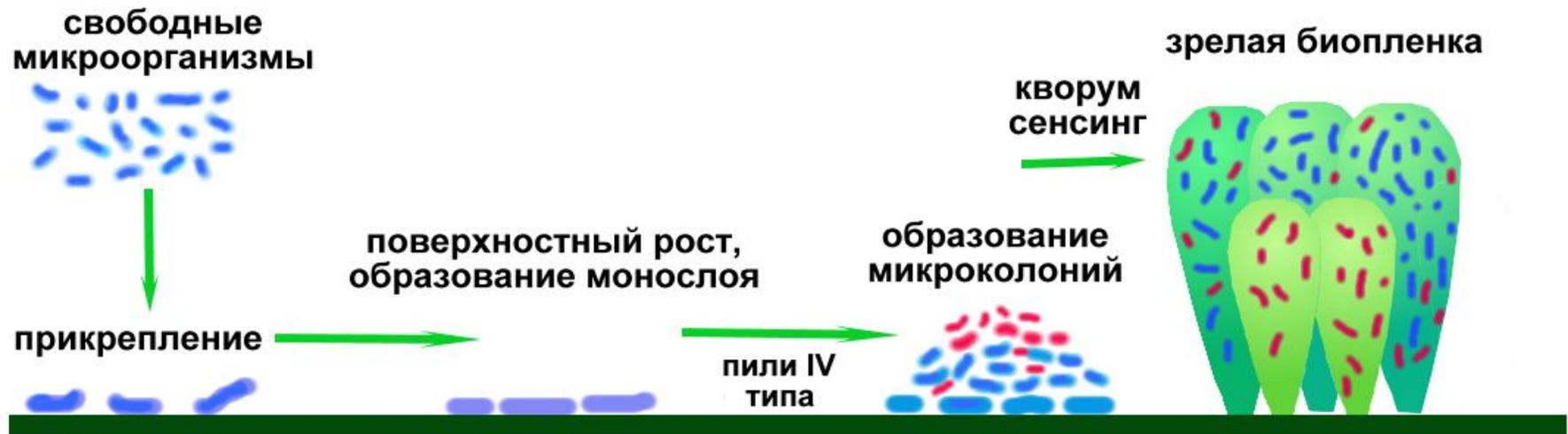


**Principles of colorimetry and turbidimetry.
600 species of bacteria or yeast can be identified.
Vitek Biomerieux**



Биопленка

– совокупность микроорганизмов разных видов, прикрепленных к твердой поверхности посредством выделяемого ими полимерного матрикса



Процесс формирования биопленок находится под контролем кворум-сенсинов, которые обеспечивают созревание биопленки и коллективные взаимоотношения между микроорганизмами в ней.

Поведение бактерий в бактериальных сообществах

«Quorum sensing» - это межклеточный механизм бактериального общения, предназначенный для контроля экспрессии генов в зависимости от плотности бактериальной популяции. По типу «quorum sensing» регулируется широкий ряд физиологических процессов, включая биoluminesценцию, синтез антибиотиков, детерминант вирулентности, перенос конъюгативных плазмид .

Механизм образования

биопленки

- После прикрепления микроорганизмы размножаются и образуют слой на твердой поверхности, благодаря пиям IV типа. Микроорганизмы передвигаются по поверхности образуя небольшие группы, или микроколонии. Микроколонии дифференцируются в зрелые и приобретают башне- или грибоподобную форму.
- Клетки в зрелой биопленке погружены в полисахаридный матрикс, в котором есть каналы для поступления нутриентов, кислорода и выведения продуктов метаболизма. Быстро растущие микроорганизмы находятся на периферии, где выше концентрация нутриентов и кислорода, медленнорастущие — глубже.
- Бактерии в составе биопленки устойчивы к микробицидным агентам, в том числе и антибиотикам.
- Формирование биопленки в организме приводит к развитию хронических и персистирующих инфекций.
- Кворум- сенсины являются мишенью для разработки новых противомикробных средств, не влияющих на жизнеспособность микроорганизмов, но нарушающих их способность вызывать заболевания.

Поведение бактерий в бактериальных сообществах

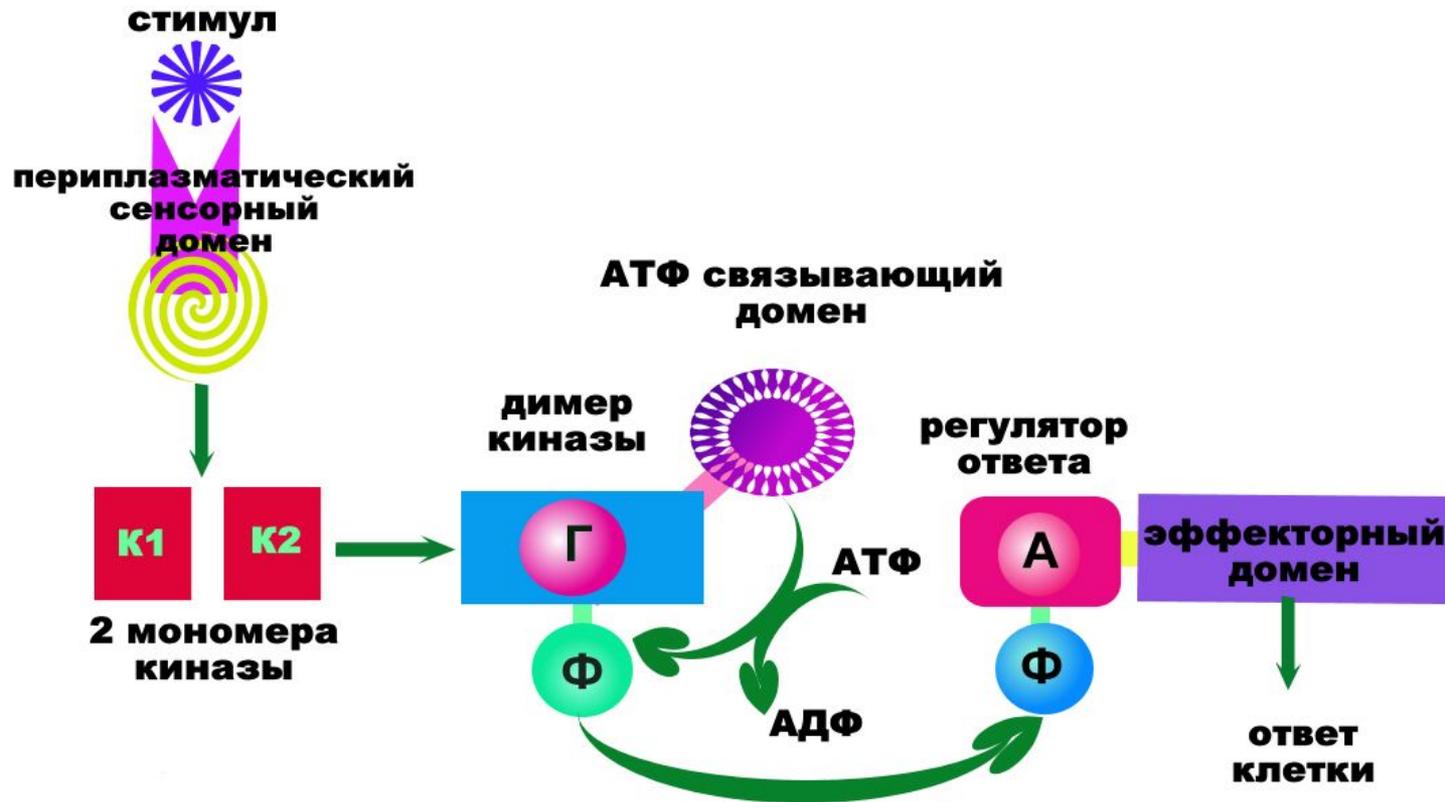
Биопленки представляют высокоорганизованные сообщества бактерий, необратимо прикрепленных к субстрату и друг к другу и защищенных продуцируемым этими клетками внеклеточным полимерным матриксом. Они снабжены каналами для водоснабжения, распределения питательных веществ между членами сообщества и удаления отходов жизнедеятельности.

Биопленки могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоят из активно функционирующих и покоящихся (некультивируемых) клеток.

Образование биопленки является одной из основных стратегий выживания бактерий в окружающей среде, поскольку в составе биопленки они защищены от антибактериальных препаратов, включая антибиотики, дезинфектанты, бактериофаги.

Многие хронические инфекции, возникновение которых связано с использованием медицинского имплантированного оборудования - катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца, обусловлены способностью бактерий расти в виде биопленок на поверхности этих устройств.

Схема устройства двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции прокариот



Двухкомпонентная сигнальная система у патогенных микроорганизмов может приводить к инициации паразитического образа жизни и развитию инфекционного заболевания, а также формированию антибиотикорезистентности